

平成 21 年 3 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591314
 研究課題名（和文） 創傷治癒過程における、B細胞およびB細胞シグナル伝達分子の
 in vivo の役割
 研究課題名（英文） The role of B lymphocytes or their signal transduction molecules
 in the wound-healing process
 研究代表者
 佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：20215792

研究成果の概要：

傷が治る過程には、様々な因子が関与するが、B細胞と呼ばれる免疫担当細胞が関わっているとは従来考えられていなかった。しかし、今回の研究で、このB細胞に発現する重要な分子であるCD19の発現を欠くマウスでは、傷の治りが悪くなり、逆にCD19を過剰に発現したマウスでは、傷の治りが良くなることから、B細胞が傷の治る過程に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 創傷治癒過程の理解の必要性

創傷治癒は人体が外界からの脅威を防御する上で、生体にとってきわめて重要なプロセスである。創傷治癒過程が適切に行われないと難治化し、感染症などのリスクに常に曝されるばかりでなく、QOLが著しく障害される。難治化潰瘍の代表例として、糖尿病性潰瘍、褥瘡、膠原病に伴う皮膚潰瘍などがあげられる。

糖尿病ではその微少血管障害、末梢神経障害などにより、特に下肢に難治性の潰瘍を生じ、しばしば患肢の切断を余儀なくされる。下肢の

静脈瘤症候群でも難治性の潰瘍が生じ、患者のQOLを著しく障害している。また高齢者では褥瘡がしばしば生じるが、不良な栄養状態などの様々な要因から難治化する。膠原病、特に全身性強皮症でも血管障害による循環障害によってしばしば潰瘍が難治化する。

これら難治性潰瘍に対して、現在使用されている薬剤よりさらに有効な薬剤の開発が切に望まれている。このためには創傷治癒過程についてより正確な理解と、その理解に基づいて創傷治癒を促進させる因子のさらなる解析が必要となる。

(2) 創傷治癒過程における炎症細胞の重要性
創傷治癒の過程は大きく分けて4つの過程から成ると考えられている。最初の過程は血液凝固期であり、創ができると血小板・フィブリンが凝集し、まず創部を塞ぐ。次いで炎症期となり、好中球、マクロファージ、リンパ球などが創部に浸潤してくる。これら炎症細胞は侵入病原体を除去するのみならず、サイトカインや細胞成長因子を放出することによって、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を活性化させ、次に続く増殖期を誘導する。増殖期では、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが増殖し、その結果再上皮化、肉芽組織の形成が起こる。その後、いったん生じた癒痕組織などを正常の組織構築に置き換える再構築期という、比較的長く続く過程が生じる。

研究代表者は以前より、炎症細胞浸潤の創傷治癒における役割に注目し、炎症細胞浸潤を制御する細胞接着分子を欠損したマウスでは、好中球やマクロファージの創部への浸潤が減少し、その結果著しい創傷治癒が生じることを報告した(Nagaoka T, Sato S, et al.: Am J Pathol 157: 237-247, 2000)。この報告によって、創傷治癒過程には炎症細胞浸潤が重要な役割を担っていることが明らかにされたが、創傷治癒過程における各種炎症細胞、特にB細胞の相対的貢献度については未だ不明である。

(3) B細胞の様々な疾患・病態への関与

創傷治癒過程においては、好中球、マクロファージ、T細胞が炎症細胞として重要な役割を担っていると考えられてきた。この観点から、創傷治癒過程におけるB細胞の役割については、ほとんど無視されてきた。これはB細胞が関与していないという理由でなく、これまでB細胞の関与を系統的に検討した研究がなかったためである。しかし、近年の分子免疫学の発展によってB細胞は単に抗体産生細胞のみならず、多種多様のサイトカインや細胞成長因子の産生細胞であり、またT細胞や樹状細胞の活性化・分化を制御する働きを有することが明らかにされている。

従来B細胞が関与すると考えられていなかった病態において、B細胞の重要性が相次いで認識されるようになった。この観点から、同様にB細胞が関与すると考えられていない創傷治癒過程においても、B細胞が創傷治癒を促進・抑制するサイトカインや細胞成長因子を産生することによって創傷治癒を制御するという仮説を立てるに至った。

(4) B細胞の機能の制御について

CD19はB細胞に特異的に発現するシグナル伝達分子であり、B細胞による免疫反応を制御す

る上で重要な機能を担っている。CD19ノックアウト(CD19^{-/-})マウスはB細胞機能不全を呈し、免疫不全に近い表現型をとり、逆にCD19を過剰に発現するCD19トランスジェニック(CD19Tg)マウスでは、B細胞が慢性的に活性化していることが示された。従って、CD19はB細胞において、その抗原受容体からのシグナルを増強する分子であることが明らかにされている。さらに、CD19はB細胞によるサイトカイン産生を制御していることも示されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、B細胞機能に重要なシグナル伝達分子であるCD19を欠損したマウス、CD19を過剰に発現したマウスを用いてB細胞の創傷治癒における*in vivo*の役割を解析することである。さらに、創傷治癒遅延が見られた場合、創部における各種サイトカインや細胞成長因子の発現を解析することによって、B細胞が創傷治癒に関与する機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスの維持と繁殖

本研究に必要なCD19^{-/-}マウス、CD19Tgマウス、およびその野生型マウスであるC57BL/6マウスは、米国Duke大学免疫学教室のThomas F. Tedder主任教授よりすでに供与され、長崎大学動物実験施設にて繁殖中である。それぞれのマウスは各遺伝子についてホモ接合体同士での繁殖が行われているため、基本的にはスクリーニングの必要はない。しかしながら、実験に用いる際には以下の方法により当該遺伝子の欠損ないしは過剰発現を確認し、結果の正確さを期する。

CD19^{-/-}マウスでは末梢血を採取の上、それぞれ抗マウスCD19抗体(MB19-1)で染色し、フローサイトメトリーによってCD19の発現が欠損していることを確認する。また、ヒトCD19を過剰に発現するCD19Tgマウスについては末梢血を抗ヒトCD19抗体(B4)で染色することによって確認する。それぞれのマウスはC57BL/6バックグラウンドへ5~10世代戻し交配済みである。7~12週齢のマウスを以下の実験に用いる。

(2) 創傷治癒の評価方法

① 創作成

エーテルで麻酔後、マウスの背部を剃毛し、70%アルコールで消毒する。マウス1匹当たり、背部に4個の全層性の創を、使い捨ての滅菌済み6mm径のパンチバイオプシーを用いて作成する。創作成後、創傷治癒過程に対する、他のマウス影響を除外するために、マウスは一匹ずつケージに入れて観察する。

②肉眼的評価(創面積)

創作成3日後、7日後にマウスに再度麻酔をかけ、創部に透明な紙を乗せ、創縁をふちどりし、その部を切り抜き、その紙の重さを量る。同じ紙で1cm²の面積の重さを量り、それを比較することによって、創面積を算出する。また、創部の感染の有無について定期的にチェックし、感染のある個体は解析から除外する。また、創の形状が類円型ではなく、歪みがあった場合には、その創は解析から除外し、各マウスで残りの創の面積の平均を解析に用いた。各解析についてそれぞれ最低10匹のマウスを用いる。

③組織学的評価(上皮間距離、肉芽組織の面積、浸潤好中球数)

創作成3日後、7日後に、創を創縁から2mm離して全層性に採取する。創を半割し、一方を3.5%パラホルムアルデヒドで固定し、次いでパラフィンで包埋する。6μmの厚さのセクションを作り、H&E染色を行う。すべてのセクションは創の中心部より切り出す。好中球は創作成1時間後、4時間後に血管外に浸潤した数をセクション全体(0.07mm²)にて数える。上皮間距離(epithelial gap)は、上皮化のため周囲より遊走してきた上皮細胞の先端の間の距離であり、再上皮化の指標となる。上皮間距離はH&E染色したセクションで測定する。肉芽組織は新たに形成された毛細血管と線維芽細胞およびマクロファージからなる組織である。組織の画像をまずCCDカメラにて映像として取り込み、video micrometerによって上皮細胞間距離および肉芽組織の面積を算出する。各解析についてそれぞれ最低10匹のマウスを用いる。

④免疫組織学的解析

創部に浸潤してきた炎症細胞数を測定するために免疫組織学的解析を行う。創作成3日後、7日後に採取した創の半割した残りを凍結し、免疫組織学的解析を行う。凍結組織から6μmの厚さのセクションを作り、アセトン固定し、phosphate-buffered saline (PBS)で希釈した10%正常ウサギ血清と37℃、10分間反応させ、非特異的な染色をブロックする。

セクションは次いでマクロファージ特異的な抗体であるF4/80、抗CD3抗体、およびB細胞特異的な抗B220抗体と室温で1時間反応させる。非特異的な染色のためのコントロールとしてラット免疫グロブリンGを用いる。セクションは次いでビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンG二次抗体と室温で、20分間反応させる。次いで、horseradish peroxidase 標識アビディン-ビオチン複合体と反応させる。各反応間で、セクションはPBSで3回洗浄を行う。セクションは3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorideとhydrogen peroxideと反応させることによって発色させる。また、メチルグリーンで

counterstainを行う。

肥満細胞はトルイジン・ブルー染色にて同定する。浸潤細胞数は、創ベッドにおいて400倍の拡大で、9カ所の視野をランダムに選び、その中の細胞数をカウントした平均値について解析を行う。9カ所の視野のうち、6カ所は創ベッドの両端から選び、残りの3カ所は創ベッドの中央から選ぶ。

(3) Real-time PCRによるサイトカイン、細胞成長因子の mRNA 発現の定量的解析

創作成3日後、7日後の創におけるサイトカイン、細胞成長因子の mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定する。サイトカインとしては、①線維芽細胞から膠原線維の産生を抑制する、interferon (IFN)- γ 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、②線維芽細胞から膠原線維の産生を増強する IL-4、IL-6 を測定する。細胞成長因子としては創傷治癒に深く関与するとされる basic fibroblast growth factor (bFGF), acidic FGF (aFGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF)- β について測定する。

具体的にはまず全 RNA を凍結皮膚組織より QIAGEN RNeasy spin column (QIAGEN 社) を用いて単離する。RNA はその後 cDNA に Reverse Transcription System (Promega 社) にて逆転写する。プライマーとプローブは Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents (Applied Biosystems) にてデザインする。Real-time PCR は以下の条件で ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて行う; 50℃、2分間を1サイクル、95℃、10分間を1サイクル、92℃、15秒間を40サイクル。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて mRNA を標準化する。

GAPDH PCR 産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を DDCt method にて算出する。つまり、fold induction は $2^{-[DDCt]}$ と定義され、ここで Ct は threshold cycle, つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。DDCt = [ターゲットとなる遺伝子の Ct (発現量不明のサンプル) - GAPDH の Ct (発現量不明のサンプル)] - [ターゲットとなる遺伝子の Ct (キャリブレーションのサンプル) - GAPDH の Ct (キャリブレーションのサンプル)]。コントロール抗体投与群ないしは野生型マウスにおけるサイトカイン mRNA 発現量をキャリブレーションとして使用する。それぞれのサンプルは triplicate で流し、平均の Ct を解析に使用する。

(4) 細胞成長因子の投与による創傷治癒遅延の改善の検討

bFGF および PDGF を投与することによって、

創傷治癒遅延が正常化されるかどうかを検討する。具体的には、bFGF および PDGF を創作成直後と 12 時間後に創に投与し、その後 occlusive dressing とする。創傷治癒過程については前述の如く評価する。

4. 研究成果

(1) 創面積、上皮間距離、および肉芽組織の面積
まず、CD19^{-/-}マウス、CD19Tg マウス、野生型マウスにおいて、受傷 3、7 日後の創面積、上皮間距離、および肉芽組織の面積について解析した。創面積は CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日、7 日共に有意に増大していた(図 1A, B)。しかし、CD19Tg マウスでは野生型マウスと有意差は認められなかった。

また、上皮化のため周囲より遊走してきた上皮細胞の先端の間の距離であり、再上皮化の指標となる上皮間距離も、CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日、7 日共に有意に増大していた(図 1C)。逆に、CD19Tg マウスでは上皮間距離は野生型マウスに比較して有意に短縮していた。

さらに、肉芽組織の面積についても、CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日、7 日共に有意に減少していた(図 1D)。対照的に、CD19Tg マウスでは、野生型マウスに比較して肉芽組織の面積は有意に増大していた。この

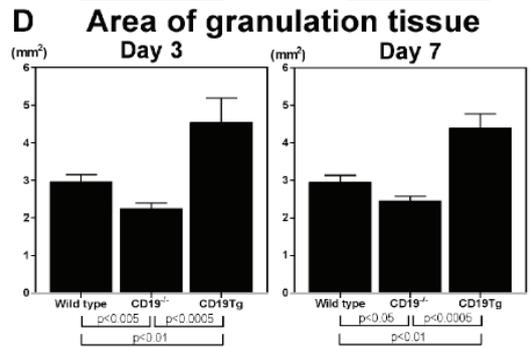
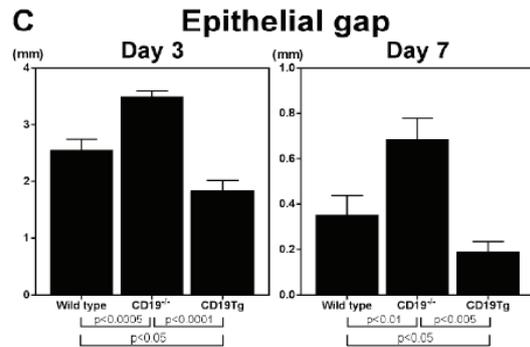
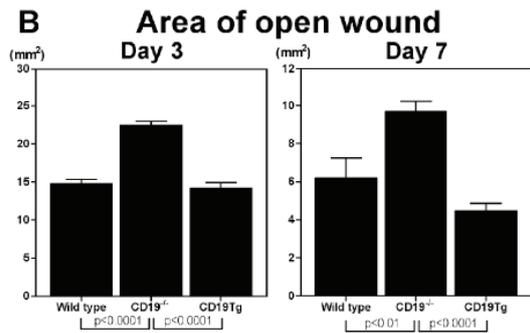
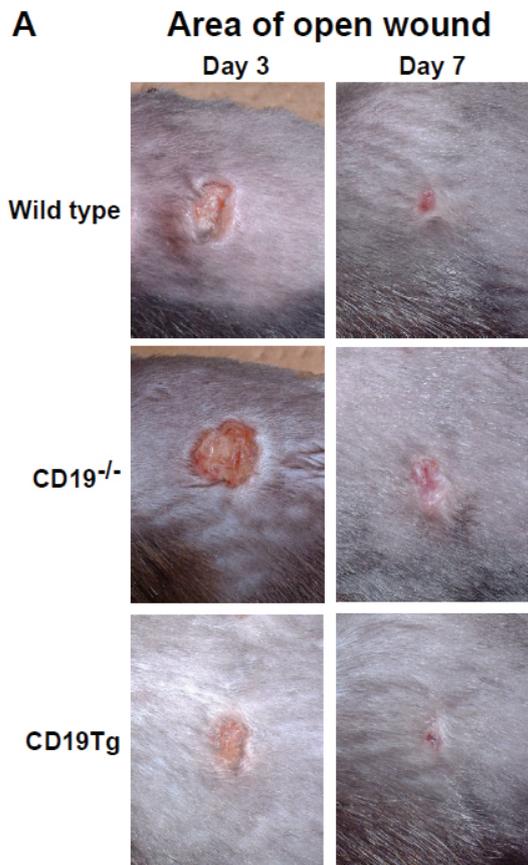


図 1. 創面積、上皮間距離、肉芽組織の面積

ように CD19^{-/-}マウスでは受傷早期から創傷治癒遅延が認められることが明らかとなり、逆に、CD19Tg マウスでは創傷治癒促進が認められることが示された。

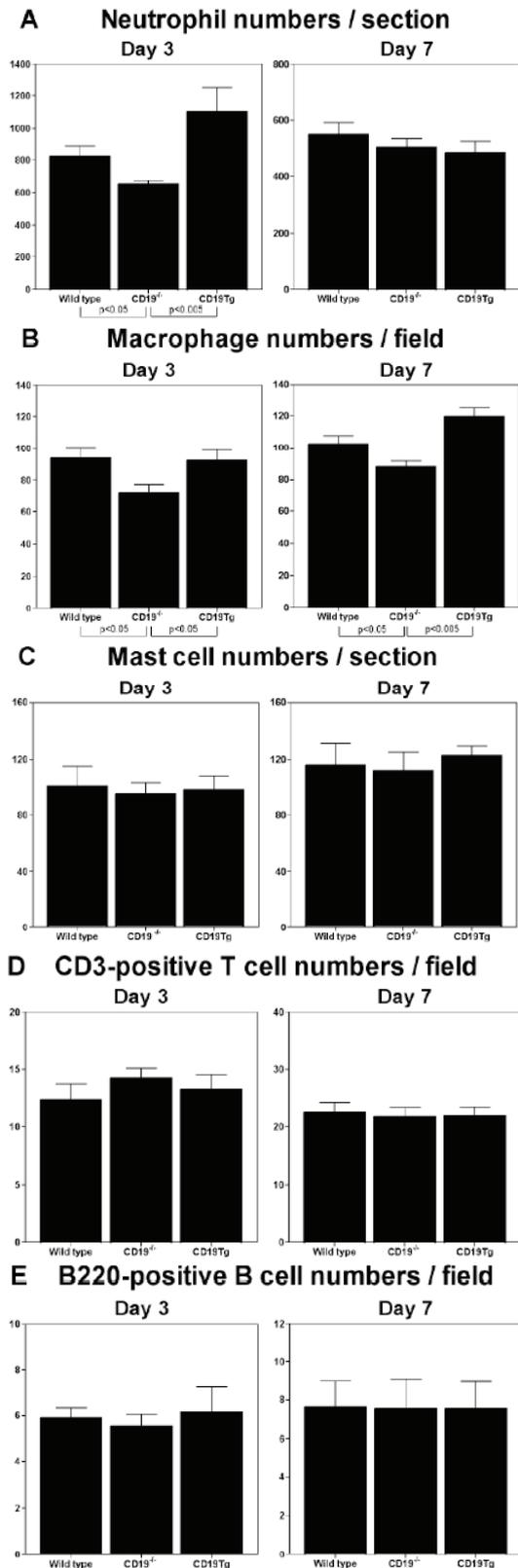
(2) 創部における炎症細胞浸潤

創部における炎症細胞浸潤については、CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日に好中球浸潤の有意な減少が認められた(図 2A)。逆に、CD19Tg マウスでは受傷後 3 日に好中球浸潤の有意な増加が認められた。

さらに、マクロファージ浸潤も CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日、7 日共に有意に減少していた(図 2B)。対照的に、マクロファージ浸潤も CD19Tg マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日、7 日共に有意に増加していた。

肥満細胞浸潤や CD3 陽性 T 細胞浸潤は CD19^{-/-}マウス、CD19Tg マウス、野生型マウスの間で有意な差は認められなかった(図 2C, D)。

抗 B220 抗体による免疫組織学的染色によってB細胞浸潤が創部に観察された(図 2F、矢印)。しかし、B細胞浸潤は、CD19^{-/-}マウス、CD19Tg マウス、野生型マウスの間で有意な差は認められなかった(図 2E)。



F B220 staining

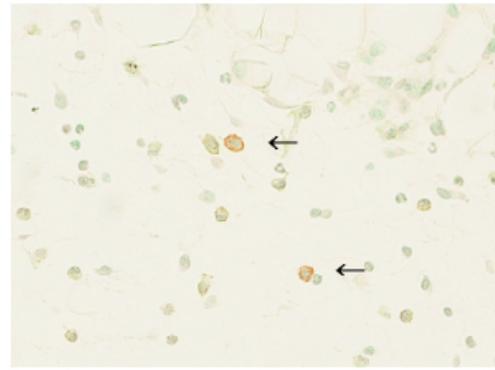


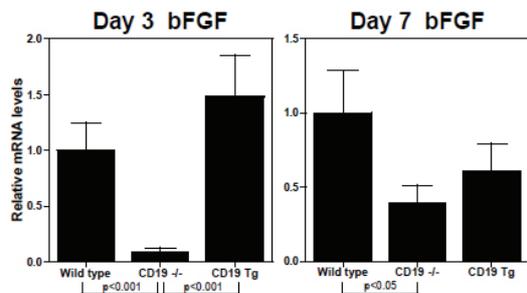
図 2. 創部の炎症細胞浸潤

(3) 創部のサイトカインおよび細胞成長因子の mRNA 発現(図 3)

創部のサイトカインおよび細胞成長因子の mRNA 発現を解析したところ、bFGF の発現は、CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日、7 日共に有意に減少していた。対照的に受傷後 3 日では、bFGF の発現は CD19Tg マウスでは野生型マウスと比較して、有意に増加していた。同様の傾向は、aFGF の発現についても認められた。

一方、PDGF、TGF- β 、IL-10 の発現については、CD19^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して、受傷後 3 日のみで有意に減少していた。逆に、CD19Tg マウスでは受傷 3 日後のみにこれらのサイトカインの発現が有意に増加していた。CD19^{-/-}マウスでは受傷 3 日後のみ、CD19Tg マウスでは受傷後 3 日、7 日共に野生型マウスと比較して、IL-6 の発現が有意に低下していた。

TNF- α の発現については、受傷 3、7 日ともに、CD19^{-/-}マウスと CD19Tg マウスとの間に有意差が認められるのみであった。IFN- γ の発現は、CD19^{-/-}マウス、CD19Tg マウス、野生型マウスの間で有意な差はなかった。このように CD19^{-/-}マウスで見られた創傷治癒遅延は、サイトカインおよび細胞成長因子の発現減少を伴い、逆に、CD19Tg マウスで見られた創傷治癒促進は、サイトカインおよび細胞成長因子の発現増加を伴っていた。



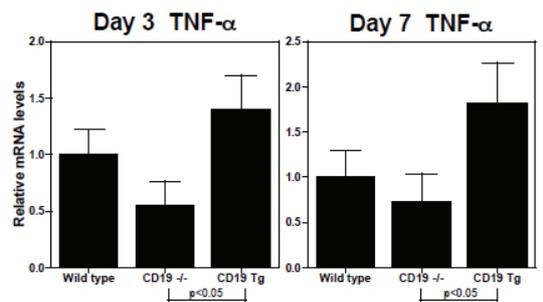
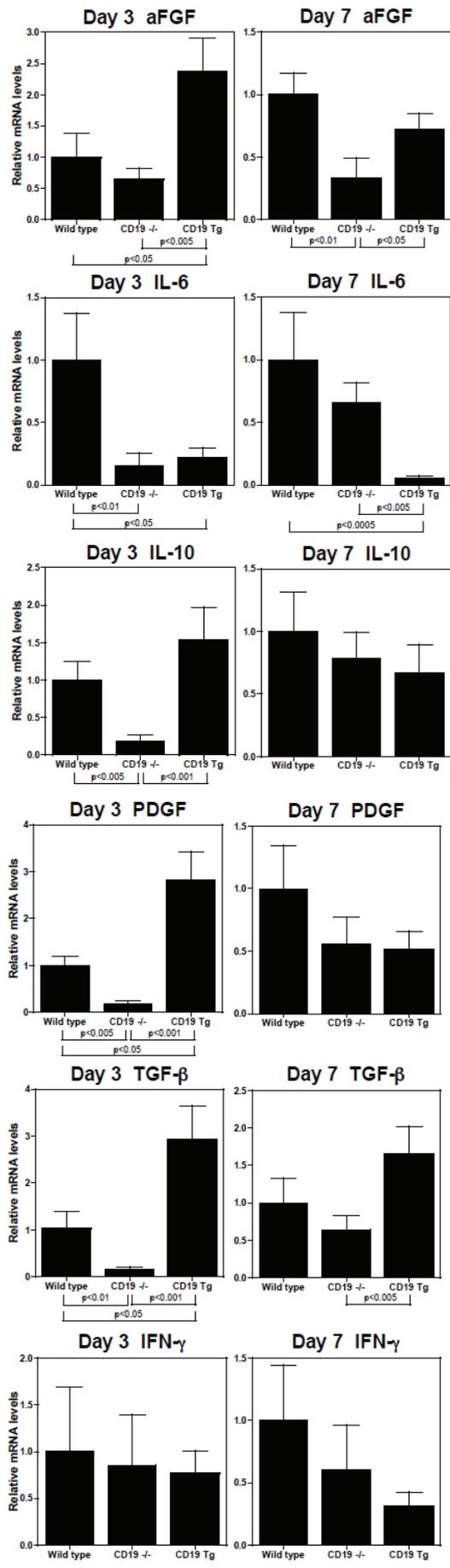


図3. 創部でのサイトカイン発現

(4) CD19^{-/-}マウスでみられた創傷治癒遅延に対する細胞成長因子投与の有効性

CD19^{-/-}マウスでみられた、この創傷治癒遅延が、bFGF や PDGF を投与することによって、正常化されるかどうかについて検討した。受傷 3 日後、無処置の CD19^{-/-}マウスと比較して、bFGF 投与を受けた CD19^{-/-}マウスでは有意に創面積が減少した。この時点で、すでに野生型マウスと bFGF の投与を受けた CD19^{-/-}マウスの間には創面積について有意差は見られなかった。受傷 3 日後、PDGF 投与によっても、無処置の CD19^{-/-}マウスと比較して有意に創面積が減少したが、その程度は bFGF と比べると軽度であった。

受傷 7 日後でも無処置の CD19^{-/-}マウスと比較して bFGF 投与を受けた CD19^{-/-}マウスでは有意に創面積が減少した。また、野生型マウスと bFGF の投与を受けた CD19^{-/-}マウスの間には創面積について有意差は見られなかった。対照的に、受傷 7 日後では、PDGF 投与によってみられた創面積の減少効果は認められなかった。従って、CD19^{-/-}マウスでみられた創傷治癒遅延を、bFGF は正常化することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

- 〔雑誌論文〕 (計 0 件)
- 〔学会発表〕 (計 0 件)
- 〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20215792

(2) 研究分担者

小川 文秀 (OGAWA FUMIHIDE)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：10333519